基于 MAPK/ERK 信号通路探讨养肺方抑制非小细胞肺癌侵袭的作用机制*

林事成[1]，庄垚雪[1]，刘殿娜[2]，刘传波[2]，李泉旺[2]

1. 北京中医药大学，北京 100029；2. 北京中医药大学东方医院，北京 100078

摘要：目的：基于丝裂原活化蛋白激酶（mitogen－activated protein kinase，MAPK）/细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinase，ERK）信号通路探索养肺方抑制非小细胞肺癌（non－small cell lung cancer，NSCLC）侵袭的作用机制。方法：利用 TCMSP、BATMAN－TCM、SwissADME 等数据库检索养肺方的化学成分和靶点。通过 GeneCards、OMIM 等数据库检索 NSCLC 靶点，并获取其与养肺方的交集靶点。通过 STRING 数据库构建蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络，筛选核心靶点。利用 R 软件进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析。Wistar 大鼠灌胃养肺方（400 g·kg^{-1}），每日 2 次，连续 7 d，制备含药血清。运用细胞转染技术构建 KRAS 过表达与 KRAS－siRNA 体系，干扰 PC9 细胞株，并分为空白对照组、含药血清组、过表达质粒组、过表达质粒＋含药血清组、siRNA 干扰组、siRNA 干扰＋含药血清组。qRT－PCR 检测细胞 *KRAS* mRNA 表达水平，Transwell 实验检测侵袭能力，Western blot 检测上皮间质转化（epithelial－mesenchymal transition，EMT）和 MAPK/ERK 通路关键蛋白表达水平。结果：养肺方含化学成分 133 个和靶点 493 个，NSCLC 靶点 2 478 个，两者共有 216 个交集靶点。核心靶点包括 TP53、AKT1、MAPK3、STAT3、JUN、MAPK1、RELA、MAPK14 等。KEGG 通路包括 P53 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、MAPK 信号通路等。qRT－PCR 显示，与空白对照组比较，含药血清组、siRNA 干扰组细胞 *KRAS* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与过表达质粒组比较，过表达质粒＋含药血清组细胞 *KRAS* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与空白对照组比较，过表达质粒组细胞侵袭数量增加，含药血清组、siRNA 干扰组细胞侵袭数量减少（$P<0.000\ 1$）。与含药血清组比较，过表达质粒＋含药血清组、siRNA 干扰＋含药血清组细胞侵袭数量减少（$P<0.05$）。与过表达质粒组比较，过表达质粒＋含药血清组、siRNA 干扰组细胞侵袭数量减少（$P<0.000\ 1$）。Western blot 显示，与空白对照组比较，含药血清组、siRNA 干扰组细胞 E－Cadherin 蛋白表达水平升高，N－Cadherin、KRAS、p－RAF1/RAF1、p－MEK1/MEK1、p－（ERK1/2）/（ERK1/2）蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；与过表达质粒组比较，过表达质粒＋含药血清组细胞 E－Cadherin 蛋白表达水平升高，N－Cadherin、KRAS、p－RAF1/RAF1、p－MEK1/MEK1、p－（ERK1/2）/（ERK1/2）蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。结论：养肺方可有效抑制 NSCLC 细胞侵袭，其机制可能与抑制 MAPK/ERK 信号通路，调控细胞 EMT 有关。

关键词：非小细胞肺癌；养肺方；MAPK/ERK 信号通路；上皮间质转化；网络药理学；王沛

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.05.135

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999（2026）05－0922－10

Mechanism of Yangfei Formula in Inhibiting Non－Small Cell Lung Cancer Invasion Based on MAPK/ERK Signaling Pathway

LIN Shicheng[1]，ZHUANG Yaoxue[1]，LIU Dianna[2]，LIU Chuanbo[2]，LI Quanwang[2]

1. Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100029；2. Dongfang Hospital，Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100078

Abstract：Objective：To explore the mechanism by which the Yangfei Formula inhibits the invasion of non－small cell lung cancer

* **基金项目**：国家中医药管理局基金项目（CXZH2024159）；北京中医药大学重点攻关项目（2020－JYB－ZDGG－127）

(NSCLC) based on the mitogen - activated protein kinase (MAPK)/extracellular regulated protein kinase (ERK) signaling pathway. Methods: The chemical components and targets of the Yangfei Formula were retrieved through databases such as TCMSP, BATMAN - TCM, and SwissADME. NSCLC targets were retrieved from databases such as GeneCards and OMIM, and the intersecting targets with the Yangfei Formula were obtained. A protein - protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING database to screen core targets. KEGG pathway enrichment analysis was performed using R software. Wistar rats were orally administered the Yangfei Formula (400 g · kg^{-1}), twice daily for 7 consecutive days to prepare drug - containing serum. Cell transfection technology was used to construct KRAS overexpression and KRAS - siRNA systems to interfere with PC9 cells, and cells were divided into blank control group, drug - containing serum group, overexpression plasmid group, overexpression plasmid plus drug - containing serum group, siRNA interference group, and siRNA interference plus drug - containing serum group. qRT - PCR was used to detect *KRAS* mRNA expression levels in cells, Transwell assays to detect invasion capability, and Western blot to detect the expression levels of epithelial - mesenchymal transition (EMT) and key proteins in the MAPK/ERK pathway. Results: The Lung - Nourishing Formula contains 133 chemical components and 493 targets, while NSCLC has 2,478 targets, with 216 overlapping targets between the two. Core targets include TP53, AKT1, MAPK3, STAT3, JUN, MAPK1, RELA, MAPK14, etc. KEGG pathways include the P53 signaling pathway, tumor necrosis factor signaling pathway, MAPK signaling pathway, and others. qRT - PCR showed that compared with the blank control group, the *KRAS* mRNA levels in cells of the drug - containing serum group and siRNA interference group were reduced ($P < 0.05$). Compared with the overexpression plasmid group, the *KRAS* mRNA levels in cells of the drug - containing serum group with overexpression plasmid were reduced ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the number of cell invasions increased in the overexpression plasmid group, but decreased in the drug - containing serum group and siRNA interference group ($P < 0.000\ 1$). Compared with the drug - containing serum group, the number of cell invasions in the overexpression plasmid drug - containing serum group and siRNA interference drug - containing serum group was reduced ($P < 0.05$). Compared with the overexpression plasmid group, the number of cell invasions in the overexpression plasmid drug - containing serum group and siRNA interference group was reduced ($P < 0.000\ 1$). Western blot showed that compared with the blank control group, the protein expression levels of E - Cadherin in cells of the drug - containing serum group and siRNA interference group were increased, while N - Cadherin, KRAS, p - RAF1/RAF1, p - MEK1/MEK1, p - (ERK1/2)/(ERK1/2) protein expression levels were decreased ($P < 0.05$); compared with the overexpression plasmid group, the protein expression levels of E - Cadherin in cells of the overexpression plasmid drug - containing serum group were increased, while N - Cadherin, KRAS, p - RAF1/RAF1, p - MEK1/MEK1, p - (ERK1/2)/(ERK1/2) protein expression levels were decreased ($P < 0.05$). Conclusion: Yangfei Formula can effectively inhibit NSCLC cell invasion, and its mechanism may be related to the inhibition of the MAPK/ERK signaling pathway and regulation of cell EMT.

Key words: non - small cell lung cancer; Yangfei Formula; MAPK/ERK signaling pathway; epithelial - mesenchymal transition; network pharmacology; Wang Pei

肺癌作为影响人类健康的常见恶性肿瘤之一，其病死率居高不下。目前，肺癌是全球癌症致死的首要原因，占癌症致死总人数的 18%，2020 年全球新发肺癌约 220 万例，病死患者约 180 万例[1]。肺癌可分为非小细胞肺癌(non - small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)两大类，其中 NSCLC 约占肺癌总数的 85%[2]。近年来，靶向治疗和免疫治疗等新疗法的发展使 NSCLC 患者的治疗效果有所改善，但由于不良反应和治疗靶点的限制，获益人群有限。因此，寻找新的治疗方法至关重要。

在肿瘤发展过程中，原发上皮来源的恶性肿瘤细胞通过上皮间质转化形成具有侵袭性的间充质状态，并赋予癌细胞多种恶性特征[3-4]。肿瘤的高转移率是影响 NSCLC 治疗效果的重要因素，也是造成肺癌患者死亡的重要原因之一，是目前肿瘤治疗的难点。自古以来，中草药被广泛应用于预防和治疗各种疾病。随着中医药现代化研究的深入，因其多靶点、多功效的特点使中医药成为抗肿瘤药物研发的热点[5]，在肺癌的辅助治疗、减轻患者症状、提高生存率等方面发挥着重要作用[6-7]。

养肺方是首都国医名师王沛教授治疗肺癌的经验方，具有益气养阴的功效，由 11 味中药组成：党参、天冬、麦冬、五味子、浙贝母、清半夏、细辛、干姜、竹茹、三七、桔梗。长期的临床研究表明，养肺方可以延长肺癌患者的生存期，降低肺癌的转移率，提高患者的生活质量[8-9]。但目前关于该方的作用机制与药物作用靶点尚无相关研究。本研究通过细胞实验观察养肺方是否可以抑制 NSCLC 的侵袭，以确定新的 NSCLC 治疗策略。为此，本研究基于网络药理

学技术探索养肺方抑制 PC9 细胞生长、细胞侵袭的多组分、多靶点和多途径调控网络，以阐明其特定生物学效应的潜在机制，为开发新型治疗药物和治疗方案提供科学依据。

1　材料

1.1　细胞　人肺腺癌 PC9 细胞株，购自武汉普诺赛生命科技有限公司，货号：CL－0668。

1.2　实验动物　雄性 Wistar 大鼠 40 只，体质量（200 ±20）g，购自北京斯贝福生物技术有限公司，许可证号为 SCXK（京）2019－0010，饲养于北京中医药大学东方医院实验动物中心 SPF 级动物房。本研究经北京中医药大学东方医院实验动物伦理委员会批准进行，批号为 202022。

1.3　药物与试剂　养肺方中药配方颗粒：党参 15 g（甘肃 19013181），天冬 12 g（湖北 19000541），麦冬 15 g（四川 19010501），五味子 6 g（辽宁 19013262），浙贝母 12 g（浙江 19006571），清半夏 15 g（甘肃 19013091），细辛 3 g（辽宁 19003761），干姜 6 g（云南 19013371），竹茹 9 g（四川 19007051），三七 6 g（云南 19014561），桔梗 9 g（安徽 19015101），由北京康仁堂药业有限公司提供，将上述中药颗粒冲泡，制成质量浓度为 40 g·mL^{-1}的药液。

RPMI－1640 培养基（美国 Hyclone 公司，货号：SH30809.01）；胎牛血清（美国 GIBCO 公司，货号：10099141）；CCK－8 细胞活性检测试剂盒（北京百瑞极公司，货号：BN15201）；RNA 抽提液（武汉 Servicebio 公司，货号：G3013）；ReverAid First Strand cDNA 合成试剂盒（美国 ThermoFisher Scientific 公司，货号：K1622）；SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒（苏州 Novoprotein 公司，货号：E096－01a）；Gp－transfect－Mate 转染试剂（苏州吉玛公司，货号：G04009）；Matrigel 基质胶（美国 BD 公司，货号：356234）；E－Cadherin（兔）抗体、N－Cadherin（兔）抗体、KRAS（兔）抗体、ERK1/2（兔）抗体、p－ERK1/2（兔）抗体、RAF1（鼠）抗体、GAPDH（兔）抗体、GAPDH（鼠）抗体、山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG（武汉 Proteintech 公司，货号：20874－1－AP、22018－1－AP、12063－1－AP、16443－1－AP、28733－1－AP、66592－1－Ig、10494－1－AP、60004－1－Ig、SA00001－2、SA00001－1）；p－MEK1（兔）抗体、p－RAF1（兔）抗体（英国 Abcam 公司，货号：ab96379、ab173539）；MEK1（鼠）抗体（美国 Santa Cruz 公司，货号：sc－6250）。

1.4　主要仪器　实时荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司，型号：ABI7300）；离心机（德国 Eppendorf 公司，型号：5425 R）；小型垂直电泳转印系统（美国 Bio－Rad 公司，型号：1658033）；凝胶成像分析系统（英国 SYNGENE 公司，型号：G：Box chemi XRQ）；多功能酶标仪（美国 MD 公司，型号：MK3）；倒置荧光显微镜（日本 Nikon 公司，型号：Ti2000）；紫外分光光度计（美国 ThermoFisher Scientific 公司，型号：NANODROP 2000）。

2　方法

2.1　网络药理学研究

2.1.1　养肺方活性成分筛选及靶点预测　从 TCMSP 数据库（https://old.tcmsp－e.com/tcmsp.php）[10]、BATMAN－TCM 数据库（http://bionet.ncpsb.org.cn/batman－tcm/）[11]、化源网（https://www.chemsrc.com）中获得养肺方有效化学成分。利用 TCMSP 数据库、SwissADME 数据库（http://www.swissadme.ch/）[12]和 Swiss Target Prediction 数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/）[13]预测药物的靶点蛋白，合并取交集后作为养肺方的靶点蛋白。最后利用 UniProt 数据库（https://www.uniprot.org/）将药物靶点蛋白与对应的靶基因进行标准化匹配。

2.1.2　NSCLC 疾病靶点筛选　通过 GeneCards（https://www.genecards.org/）、OMIM（https://www.omim.org/）、CTD（https://ctdbase.org/）数据库，以“Non－Small Cell Lung Cancer”为关键词，检索与 NSCLC 相关的潜在靶点，合并结果、删除重复值，获得 NSCLC 靶点基因。

2.1.3　养肺方－NSCLC 交集靶点筛选　将筛选出的养肺方靶点基因和 NSCLC 疾病靶点基因取交集，获得疾病与药物共同作用的潜在靶点，并通过 Bioinformatics & Evolutionary Genomics 平台（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/）绘制韦恩图。

2.1.4　养肺方－NSCLC 蛋白互作网络图构建及核心靶点筛选　将获取的养肺方－NSCLC 交集靶点导入 STRING（https:/string－db.org/）平台，设置

条件“Homo sapiens，highest confidence = 0.9”，构建蛋白质 - 蛋白质相互作用（protein - protein interaction，PPI）网络。将 PPI 网络图导入 Cytoscape 3.9.1 软件，根据 degree 值筛选核心靶点。

2.1.5　基因本体（Gene Ontology，GO）及京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析　通过 R 软件对养肺方 - NSCLC 交集靶点进行富集分析，包括 GO 生物过程（biological process，BP）、分子功能（molecular function，MF）、细胞组分（cellular component，CC）和 KEGG 通路，以 $P<0.01$ 为条件进行筛选。

2.2　细胞实验验证

2.2.1　养肺方含药血清制备　将 Wistar 大鼠随机分为对照组、养肺方组，每组 20 只。养肺方组大鼠灌胃剂量为 400 g·kg^{-1}，灌胃体积为 10 mL·kg^{-1}，每日 2 次，连续 7 d，于末次给药后 1 h 麻醉，经腹主动脉采血，静置 2 h 后，3 500 r·min^{-1}离心 20 min，分离血清，经 56 ℃水浴灭活 30 min，-20 ℃冰箱保存备用。

2.2.2　细胞培养　PC9 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 RPMI - 1640 培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养，每 2 天换液 1 次，细胞贴壁面积达 70% 时进行传代培养。

2.2.3　CCK - 8 法检测养肺方对细胞增殖的影响　取对数生长期 PC9 细胞，胰酶消化后，调整细胞浓度为 1×10^5 mL^{-1}，取 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板，分为空白组（只含完全培养基）、对照组（含 20% 对照血清培养基）、含药血清组（含 20%、15%、10%、5%、2.5% 养肺方含药血清培养基），每组 3 个复孔。继续培养 24 h，每孔加入 10 μL CCK - 8 试剂，恒温箱培养 2 h 后，在全波长酶标仪 450 nm 处测量光密度（optical density，OD）值，计算细胞活力，筛选养肺方最佳给药浓度，随后用养肺方最佳给药浓度分别干预 24 h、48 h、72 h，观察细胞增殖是否呈时间依赖性。

细胞活力 =（含药血清组 OD 值 - 空白组 OD 值）/（对照组 OD 值 - 空白组 OD 值）×100%

2.2.4　细胞转染　取对数生长期 PC9 细胞，调整细胞浓度为 3×10^5 mL^{-1}，接种于 6 孔板，每孔 2 mL，孵育至生长融合度 70% ~ 80%。在 1.5 mL 无菌离心管中加入无血清培养基，每孔 200 μL。根据 Gp - transfect - Mate 说明书分别于离心管中加入 KRAS 过表达质粒、KRAS - siRNA 以及相应转染试剂，室温静置 5 min；将混有转染试剂的液体转移入另一管中混匀，室温静置 20 min。更换 6 孔板中完全培养液并加入混合物，每孔 400 μL，置于 37 ℃恒温细胞培养箱中转染 5 h 后，更换新鲜完全培养基后继续培养 24 h。

2.2.5　实验分组　空白对照组：10% 对照血清培养液；含药血清组：10% 养肺方含药血清培养液；过表达质粒组：10% 对照血清培养液 + KRAS 过表达质粒；过表达质粒 + 含药血清组：10% 含药血清培养液 + KRAS 过表达质粒；siRNA 干扰组：10% 对照血清培养液 + KRAS - siRNA；siRNA 干扰 + 含药血清组：10% 含药血清培养液 + KRAS - siRNA，干预培养时间为 24 h。

2.2.6　qRT - PCR 法检测细胞 *KRAS* mRNA 表达水平　取出各组细胞，根据试剂盒说明书使用 RNA 抽提液，经提取、沉淀、洗涤和溶解后获得总 RNA，逆转录成 cDNA，qRT - PCR 法检测 *KRAS* mRNA 表达水平，内参基因为 *β - actin*，反应程序为：95 ℃ 1 min，95 ℃ 20 s，60 ℃ 1 min，共 40 个循环。引物序列如下：*KRAS* 上游：5′ - TGTGGACGAATATGATCCAACA - 3′，下游：5′ - GCAAATACACAAAGAAAGCCCT - 3′；*β - actin* 上游：5′ - CCTGGCACCCAGCACAAT - 3′，下游：5′ - GGGCCGGACTCGTCATAC - 3′。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 *KRAS* mRNA 的相对表达量。

2.2.7　Transwell 实验检测细胞侵袭能力　将提前水化的基质胶与 RPMI - 1640 培养基按 1∶8 比例混匀，每个 Transwell 小室上室中加入 80 μL 稀释后的基质胶，放入 37 ℃孵育箱内过夜。各组细胞培养 24 h 后进行消化，用基础培养基重悬，调整细胞浓度为 1×10^5 mL^{-1}，取 200 μL 细胞悬液加入上室中，下室加入 500 μL 完全培养基，置于细胞培养箱中培养 24 h。

将小室用磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffered saline，PBS）洗涤 3 次；上室加入 200 μL 4% 多聚甲醛，下室加入 500 μL 4% 多聚甲醛室温固定 2 min，PBS 洗涤 2 次；上室加入 200 μL 无水甲醇，下室加入 500 μL 无水甲醇室温通透 20 min；PBS 洗涤 3 次，在下室加入 500 μL 结晶紫溶液染色 10 min；PBS 洗小室 3 次，用棉签擦掉上室内壁残留细胞，干燥，上室下壁置于载玻片上，于显微镜下观察拍照。

2.2.8　Western blot 检测细胞 EMT 和 MAPK/ERK 通路关键蛋白表达水平　各组细胞经 PBS 洗

涤 3 次，加入 RIPA 裂解液 150 μL，冰上裂解 30 min，离心取上清液，BCA 法进行蛋白定量，100 ℃变性，每组蛋白上样 20 μg，120 V 恒压电泳，100 V 恒压转膜，10% 脱脂奶粉封闭 1 h，加入一抗工作液 E－Cadherin（1∶5 000）、N－Cadherin（1∶5 000）、KRAS（1∶5 000）、ERK1/2（1∶3 000）、p－ERK1/2（1∶3 000）、RAF1（1∶3 000）、MEK1（1∶200）、GAPDH（1∶50 000）、p－RAF1（1∶3 000）、p－MEK1（1∶3 000），室温孵育 1.5 h；加入山羊抗兔或鼠二抗（1∶10 000）室温孵育 1 h，超敏 ECL 发光检测，采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.3　统计学方法　采用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据，GraphPad Prism 9.0 软件绘图，符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组样本比较以单因素方差分析检验，满足方差齐性的组间两两比较用 *LSD－t* 检验，方差不齐的采用 *Welch* 检验；若数据不满足正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　网络药理学分析结果　通过 TCMSP 等数据库共筛选出 133 个养肺方的有效成分，其潜在作用靶点共有 493 个。通过 GeneCards、OMIM 等数据库共收集到 NSCLC 相关的作用靶点 2 478 个，其与养肺方共有 216 个交集靶点，见图 1。PPI 网络分析发现，养肺方治疗 NSCLC 的核心靶点包括 TP53、AKT1、MAPK3、STAT3、JUN、MAPK1、RELA、MAPK14 等，见图 2。

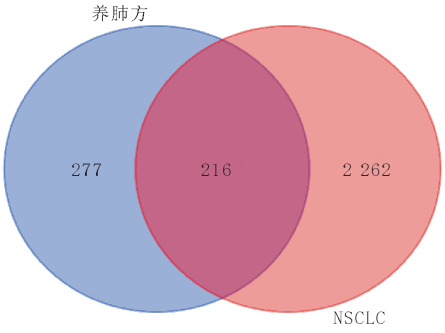


图 1　养肺方与 NSCLC 交集靶点韦恩图

运用 R 软件进行 GO 富集分析发现，BP 主要涉及氧化应激反应、活性氧代谢过程、脂多糖的调节等；MF 主要与转录因子、细胞因子、核转录因子、磷酸酶结合、抗氧化活性、细胞因子活性、过氧化物酶活性等相关；CC 主要富集到胞质囊腔、线粒体外膜、细胞外基质等，见图 3。KEGG 富集分析共筛选了 183 条信号通路，主要包括 P53 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、MAPK 信号通路，见图 4。通过文献调研，我们选择 MAPK/ERK 信号通路进行后续研究，见图 5。

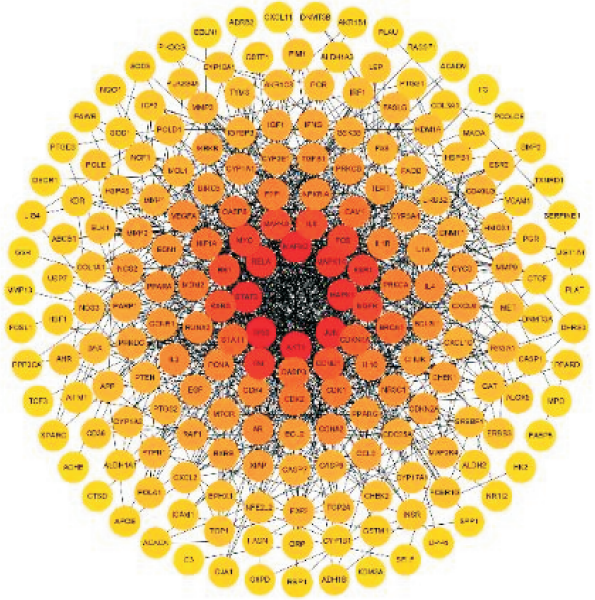


图 2　药物－疾病交集靶点 PPI 网络图

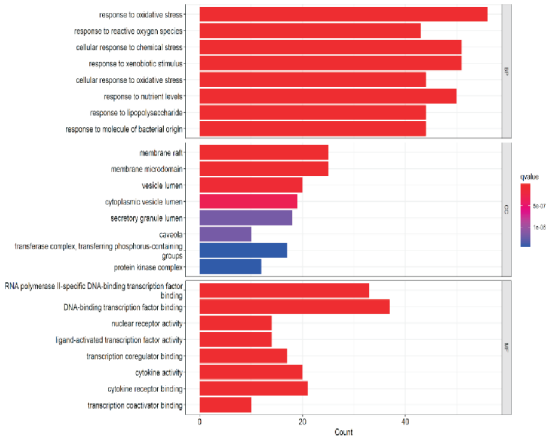


图 3　GO 富集分析条形图

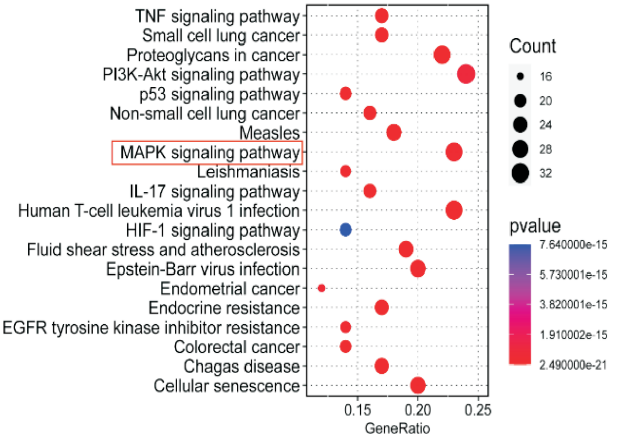


图 4　KEGG 富集分析气泡图

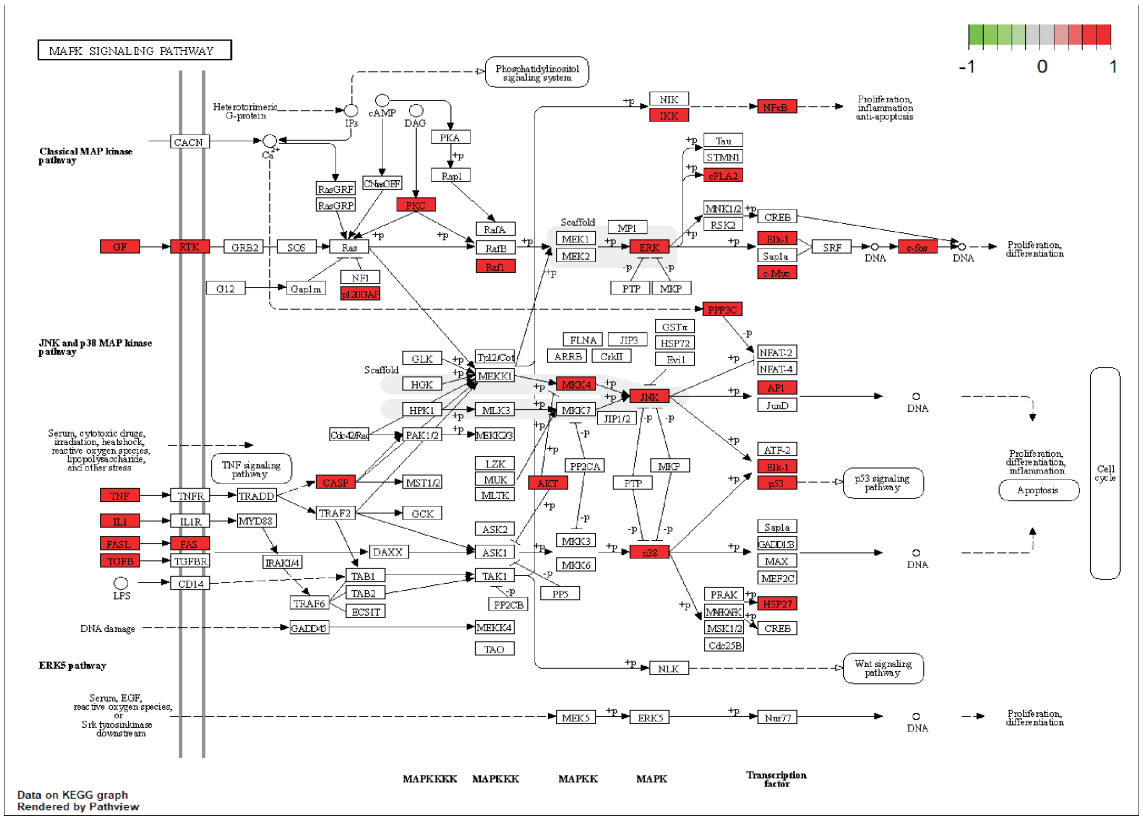


图 5　MAPK 信号通路网络图

3.2　动物实验结果

3.2.1　养肺方最佳浓度和作用时间　各浓度养肺方含药血清对 PC9 细胞增殖活性的影响见表 1，养肺方含药血清干预 24 h 后均能明显抑制 PC9 细胞增殖（$P<0.000\ 1$），但不具有浓度依赖性。当养肺方含药血清浓度为 10% 时，对 PC9 细胞的增殖抑制效果最佳。

以细胞毒性最强的 10% 养肺方含药血清分别干预 PC9 细胞 24 h、48 h、72 h，细胞活力分别为（53.61 ± 4.68）%、（70.92 ± 0.32）%、（73.53 ± 2.97）%，可见干预 24 h 时抑制作用最明显（$P<0.01$），见图 6。

表 1　不同浓度养肺方含药血清对细胞活力的影响　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	细胞活力/%
对照组	3	100.00 ± 1.82
20% 含药血清组	3	86.24 ± 0.55 **** ####
15% 含药血清组	3	71.36 ± 1.57 **** ####
10% 含药血清组	3	50.77 ± 1.44 ****
5% 含药血清组	3	55.23 ± 0.37 **** ###
2.5% 含药血清组	3	88.25 ± 1.01 **** ####

注：与对照组比较，**** $P<0.000\ 1$；与 10% 含药血清组比较，### $P<0.001$，#### $P<0.000\ 1$。

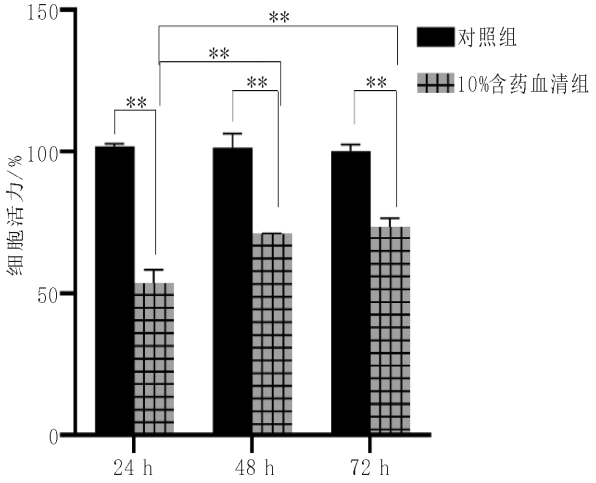


图 6　10% 养肺方含药血清在不同时间对细胞增殖的影响

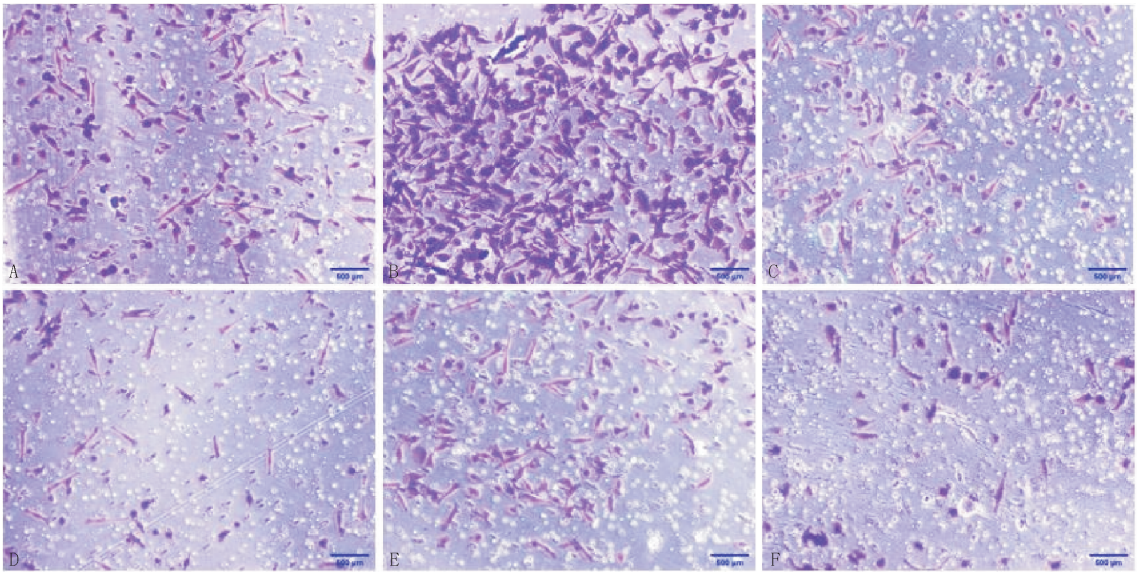
3.2.2　养肺方调控 *KRAS* mRNA 表达水平　qRT－PCR 显示，与空白对照组比较，过表达质粒组细胞 *KRAS* mRNA 水平升高，含药血清组、siRNA 干扰组细胞 *KRAS* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。与过表达质粒组比较，过表达质粒 + 含药血清组细胞 *KRAS* mRNA 水平降低（$P<0.05$）。siRNA 干扰 + 含药血清组与 siRNA 干扰组比较，细胞 *KRAS* mRNA 水平的差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2。以上结果表明，养肺方含药血清与 KRAS－siRNA 的效果相当。

表 2　各组细胞 *KRAS* mRNA 表达水平比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	*KRAS* mRNA
空白对照组	3	1.00 ± 0.32
含药血清组	3	0.29 ± 0.13 *
过表达质粒组	3	1 207.00 ± 446.00 *
过表达质粒 + 含药血清组	3	20.51 ± 7.69 #
siRNA 干扰组	3	0.17 ± 0.08 ***
siRNA 干扰 + 含药血清组	3	0.13 ± 0.03

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$，*** $P < 0.001$；与过表达质粒组比较，# $P < 0.05$。

3.2.3　养肺方对 PC9 细胞侵袭能力的影响　与空白对照组比较，过表达质粒组细胞侵袭数量增加，含药血清组、siRNA 干扰组细胞侵袭数量减少（$P < 0.000\ 1$）。与含药血清组比较，过表达质粒 + 含药血清组、siRNA 干扰 + 含药血清组细胞侵袭数量减少（$P < 0.05$）。与过表达质粒组比较，过表达质粒 + 含药血清组、siRNA 干扰组细胞侵袭数量减少（$P < 0.000\ 1$）。siRNA 干扰 + 含药血清组与 siRNA 干扰组比较，细胞侵袭数量的差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表 3、图 7。



注：A：空白对照组；B：含药血清组；C：过表达质粒组；D：过表达质粒 + 含药血清组；E：siRNA 干扰组；F：siRNA 干扰 + 含药血清组。

图 7　Transwell 细胞侵袭实验图（100 ×）

表 3　各组细胞侵袭数量比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞侵袭数量/个
空白对照组	3	150.30 ± 21.43
含药血清组	3	55.93 ± 4.39 ****
过表达质粒组	3	178.10 ± 5.69 **
过表达质粒 + 含药血清组	3	35.67 ± 8.96 #^^^^
siRNA 干扰组	3	27.73 ± 4.08 ****^^^^
siRNA 干扰 + 含药血清组	3	19.00 ± 2.36 ###

注：与空白对照组比较，** $P < 0.01$，**** $P < 0.000\ 1$；与含药血清组比较，# $P < 0.05$，### $P < 0.001$；与过表达质粒组比较，^^^^ $P < 0.000\ 1$。

3.2.4　养肺方抑制 PC9 细胞的 EMT　Western blot 显示，与空白对照组比较，过表达质粒组细胞 E－Cadherin 蛋白表达水平降低，N－Cadherin 蛋白表达水平升高（$P < 0.05$）；与空白对照组比较，含药血清组、siRNA 干扰组细胞 E－Cadherin 蛋白表达水平升高，N－Cadherin 蛋白表达水平降低（$P < 0.05$）；与过表达质粒组比较，过表达质粒 + 含药血清组细胞 E－Cadherin 蛋白表达水平升高，N－Cadherin 蛋白表达水平降低（$P < 0.05$），见表 4、表 5、图 8。

表 4　养肺方逆转 KRAS 过表达引起的 EMT　($\bar{x} \pm s$)

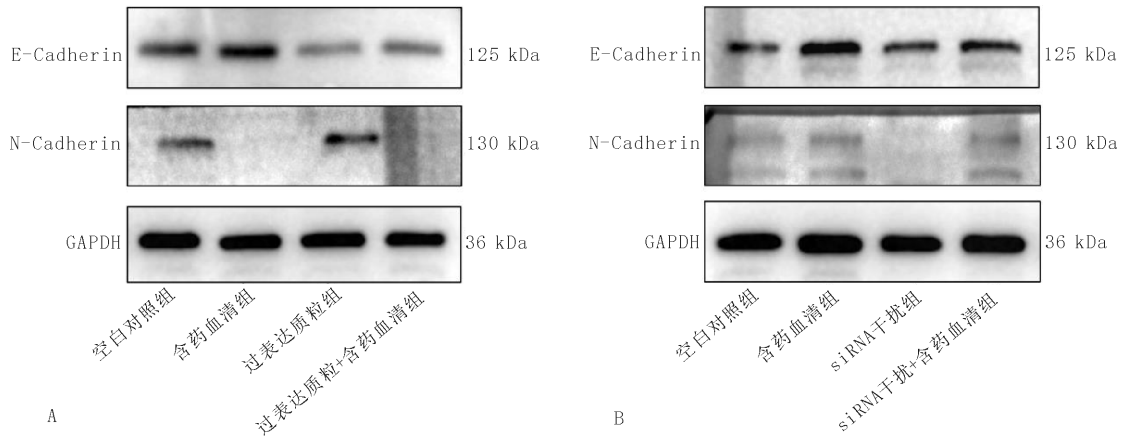
组别	n	E－Cadherin/GAPDH	N－Cadherin/GAPDH
空白对照组	3	7.73 ± 0.81	6.71 ± 1.36
含药血清组	3	11.54 ± 1.57 **	1.90 ± 1.08 **
过表达质粒组	3	4.53 ± 0.54 **	10.40 ± 2.47 *
过表达质粒 + 含药血清组	3	6.52 ± 0.31 #	2.79 ± 0.45 ###

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$；与过表达质粒组比较，# $P < 0.05$，### $P < 0.001$。

表 5　养肺方对敲降 KRAS 后 EMT 的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E－Cadherin/GAPDH	N－Cadherin/GAPDH
空白对照组	3	4.49 ± 0.80	5.69 ± 1.86
含药血清组	3	11.02 ± 3.85 *	2.85 ± 0.70 *
siRNA 干扰组	3	9.36 ± 2.90 *	2.08 ± 1.10 **
siRNA 干扰 + 含药血清组	3	10.31 ± 0.63	3.34 ± 0.68

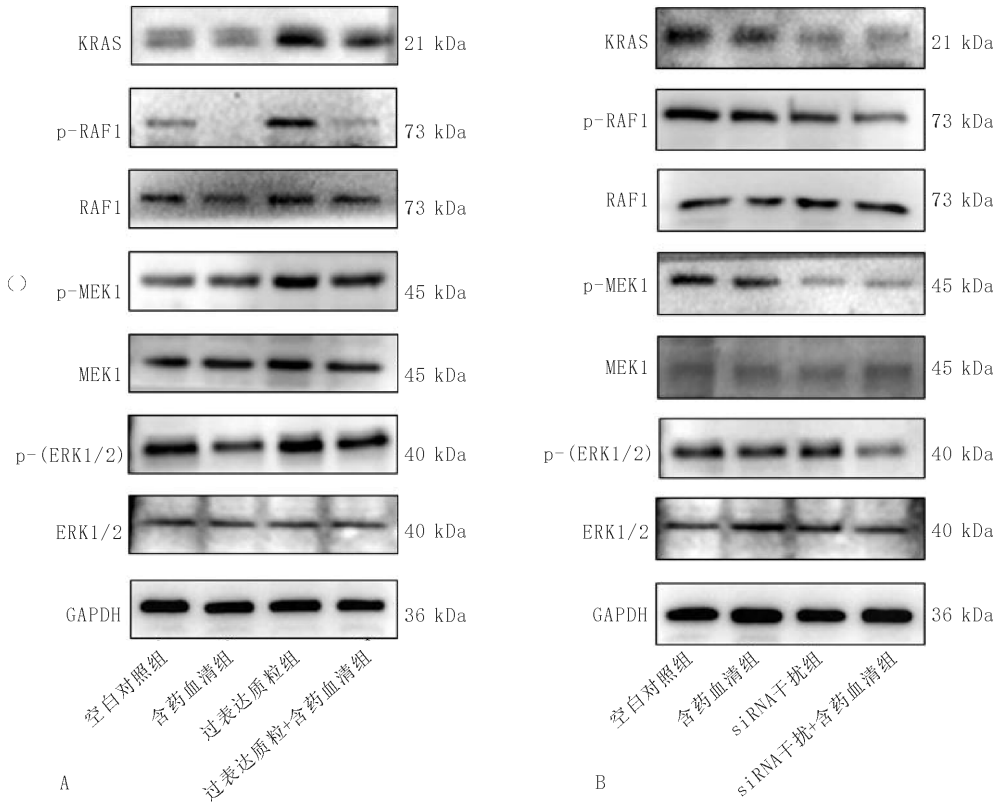
注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$。



注：A：KRAS 过表达后 E－Cadherin、N－Cadherin 蛋白条带图；B：敲降 KRAS 后 E－Cadherin、N－Cadherin 蛋白条带图。

图 8　养肺方对 PC9 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

3.2.5　养肺方抑制 MAPK/ERK 信号通路　Western blot 显示，与空白对照组比较，过表达质粒组细胞 KRAS、p－RAF1/RAF1、p－MEK1/MEK1、p－(ERK1/2)/(ERK1/2)蛋白表达水平升高($P<0.05$)；与空白对照组比较，含药血清组、siRNA 干扰组细胞 KRAS、p－RAF1/RAF1、p－MEK1/MEK1、p－(ERK1/2)/(ERK1/2)蛋白表达水平降低($P<0.05$)；与过表达质粒组比较，过表达质粒＋含药血清组细胞 KRAS、p－RAF1/RAF1、p－MEK1/MEK1、p－(ERK1/2)/(ERK1/2)蛋白表达水平降低($P<0.05$)；siRNA 干扰＋含药血清组与 siRNA 干扰组比较，细胞 KRAS、p－RAF1/RAF1、p－MEK1/MEK1、p－(ERK1/2)/(ERK1/2)蛋白表达水平的差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 6、表 7、图 9。以上结果说明，过表达 KRAS 可激活 MAPK/ERK 信号通路。此外，养肺方可能作用于 MAPK/ERK 信号通路下游分子，养肺方含药血清与 KRAS－siRNA 的效果相当。



注：A：KRAS 过表达后 MAPK/ERK 通路蛋白条带图；B：敲降 KRAS 后 MAPK/ERK 通路蛋白条带图。

图 9　养肺方对 PC9 细胞 MAPK/ERK 通路蛋白表达的影响

表 6　养肺方对过表达 KRAS 后细胞 MAPK/ERK 通路蛋白表达水平的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	KRAS/GAPDH	p－RAF1/RAF1	p－MEK1/MEK1	p－(ERK1/2)/(ERK1/2)
空白对照组	3	11.44 ± 0.43	12.34 ± 0.29	17.45 ± 0.73	19.98 ± 0.38
含药血清组	3	8.41 ± 0.72***	5.42 ± 0.89*	12.93 ± 1.95**	14.17 ± 2.86*
过表达质粒组	3	18.33 ± 1.11***	18.87 ± 5.36*	20.35 ± 2.75*	26.18 ± 3.63*
过表达质粒 + 含药血清组	3	15.31 ± 1.95#	10.40 ± 1.40###	14.64 ± 0.98###	17.10 ± 1.41#

注：与空白对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$；与过表达质粒组比较，# $P<0.05$，### $P<0.001$。

表 7　养肺方对敲降 KRAS 后细胞 MAPK/ERK 通路蛋白表达水平的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	KRAS/GAPDH	p－RAF1/RAF1	p－MEK1/MEK1	p－(ERK1/2)/(ERK1/2)
空白对照组	3	15.72 ± 1.11	8.95 ± 0.43	9.87 ± 0.47	11.09 ± 0.69
含药血清组	3	12.29 ± 0.99**	4.40 ± 2.99**	7.54 ± 0.62**	7.63 ± 2.10*
siRNA 干扰组	3	8.89 ± 3.55**	4.71 ± 1.66**	5.43 ± 0.73***	6.70 ± 1.87*
siRNA 干扰 + 含药血清组	3	7.20 ± 3.13	3.28 ± 1.08	4.99 ± 1.22	5.31 ± 1.43

注：与空白对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$。

4　讨论

肺癌转移影响患者的治疗积极性，远处转移带来的多器官受累影响了患者的生活质量。因此，控制肿瘤的侵袭转移是亟待攻克的医学难题。近年来，中医药在延缓肺癌进展、改善患者生活质量方面展现出极大潜力[14-17]。然而，如何用现代医学解释中药复方各组分发挥的复杂作用，一直是中医研究所面临的重大挑战。随着系统生物学和生物信息学的发展，网络药理学应运而生，其可全面挖掘中药的潜在分子机制。本研究旨在运用网络药理学方法，探讨养肺方治疗 NSCLC 的潜在分子机制，并通过体外细胞实验加以验证。

EMT 是肿瘤发生侵袭转移的主要原因之一，肿瘤细胞在复杂的分子信号通路作用下发生 EMT 并进一步造成侵袭、转移[18]。EMT 的特异细胞因子和信号传导通路已成为当下肿瘤研究的热门靶点，在肿瘤治疗方面具有广阔的研究前景[19]。本研究利用 KEGG 富集分析发现养肺方治疗肺癌的作用靶点集中在 MAPK/ERK 信号通路。MAPK/ERK 信号通路被认为是经典的 MAPK 信号通路，可以促进细胞增殖和分化，加速癌细胞转移[20]。*RAS* 基因是一组具有高突变率的原癌基因，由 KRAS、NRAS、HRAS 组成，其中最常见的一种类型是 KRAS，约占 86%[21]，也是肺腺癌中常见的基因突变类型之一，约占 30%[22]。其翻译产物 RAS 蛋白具有 GTPase 活性，并在活性鸟苷三磷酸（guanosine triphosphate，GTP）结合和非活性鸟苷二磷酸（guanosine diphosphate，GDP）结合状态之间切换，对 RAS 介导的信号传导过程具有分子开关的作用，是 ERK 途径中的第一个细胞内效应子，其可由各种细胞外刺激触发激活[23-24]。RAS 活化后，刺激 RAF（RAF1、A－RAF、B－RAF 及 C－RAF）蛋白通过磷酸化修饰被激活，此时 RAF 充当 MAPK 激酶激活 MEK1 和 MEK2，然后促进 ERK1 和 ERK2 激酶的激活，由它们易位到细胞核中，ERK1 和 ERK2 也是 MAPK/ERK 途径的最终效应分子。一旦被激活，ERK1/2 广泛磷酸化参与各种细胞活动，如细胞增殖、分化、侵袭转移和血管生成[25]。

养肺方作为治疗肺癌的经验方，在临床运用中发挥了重要作用。但是养肺方发挥疗效的有效成分复杂，作用机制多维度多样化，既往单味药的研究难以全面描述。本研究以网络药理学的分析为基础，初步筛选了养肺方治疗 NSCLC 的作用通路。通过细胞实验研究进一步验证发现，养肺方对 NSCLC 的作用与 KRAS 表达密切相关，经养肺方干预后，PC9 细胞 KRAS 表达下降，继而通过 MAPK/ERK 信号通路影响肺癌细胞 EMT 过程，抑制了肿瘤侵袭能力，通过细胞转染实验进一步验证了这一结论；养肺方可以逆转 KRAS 过表达引起的下游通路激活及 PC9 细胞的侵袭能力，同时也发现这种抑制效果与敲降 KRAS 的细胞株表现相当，对敲降 KRAS 的细胞没有进一步作用。

综上所述，养肺方可有效抑制 NSCLC 细胞侵袭，其机制可能与抑制 MAPK/ERK 信号通路，调控细胞 EMT 有关。

参考文献：

[1] SUNG H，FERLAY J，SIEGEL R L，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin，2021，71(3)：209－249.

[2] SINGH T，FATEHI HASSANABAD M，FATEHI HAS-

SANABAD A. Non – small cell lung cancer: Emerging molecular targeted and immunotherapeutic agents[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876(2): 188636.
[3] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 31 – 46.
[4] LAMBERT A W, PATTABIRAMAN D R, WEINBERG R A. Emerging biological principles of metastasis[J]. Cell, 2017, 168(4): 670 – 691.
[5] LIU D N, LIN S C, LI Y, et al. Network pharmacology and experimental verification to explore the potential mechanism of Yin – Huo – Tang for lung adenocarcinoma recurrence[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 375 – 395.
[6] HAN Y, WANG H, XU W R, et al. Chinese herbal medicine as maintenance therapy for improving the quality of life for advanced non – small cell lung cancer patients[J]. Complement Ther Med, 2016, 24: 81 – 89.
[7] WU X Y, CHUNG V C H, LU P, et al. Chinese herbal medicine for improving quality of life among nonsmall cell lung cancer patients: overview of systematic reviews and network meta – analysis[J]. Medicine, 2016, 95(1): e2410.
[8] 何佩珊, 冯兴中, 杨公博, 等. 养肺方治疗老年晚期非小细胞肺癌氩氦刀冷冻术后并发症的临床研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(2): 228 – 231, 235.
[9] 何佩珊, 胡凯文, 杨公博, 等. 中药“养肺方”联合氩氦刀冷冻治疗老年晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3808 – 3811.
[10] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
[11] LIU Z Y, GUO F F, WANG Y, et al. BATMAN – TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechANism of traditional Chinese medicine[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21146.
[12] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. iLOGP: a simple, robust, and efficient description of n – octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach[J]. J Chem Inf Model, 2014, 54(12): 3284 – 3301.
[13] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357 – W364.
[14] TANG M, WANG S M, ZHAO B, et al. Traditional Chinese medicine prolongs progression – free survival and enhances therapeutic effects in epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR – TKI) treated non – small – cell lung cancer (NSCLC) patients harboring EGFR mutations[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 8430 – 8437.
[15] XIA Y W, HAN H K, GU R J, et al. The efficacy and hemorheological indexes of ginseng and its active components for patients with non – small cell lung cancer: a systematic review and meta – analysis[J]. J Oncol, 2023, 2023: 3144086.
[16] WANG Y J, WU G Y, LI R, et al. Chinese medicine combined with EGFR – TKIs prolongs progression – free survival and overall survival of non – small cell lung cancer (NSCLC) patients harboring EGFR mutations, compared with the use of TKIs alone[J]. Front Public Health, 2021, 9: 677862.
[17] SU X L, WANG J W, CHE H, et al. Clinical application and mechanism of traditional Chinese medicine in treatment of lung cancer[J]. Chin Med J, 2020, 133(24): 2987 – 2997.
[18] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3): 212 – 226.
[19] 王晨, 燕苗苗, 邱志广, 等. 金水缓纤方联合针刺对肺纤维化大鼠上皮间质转化及 TGF – β1/Smad2/3 通路的影响[J]. 中医学报, 2025, 40(8): 1597 – 1605.
[20] LAI Q, WANG M, HU C M, et al. Circular RNA regulates the onset and progression of cancer through the mitogen – activated protein kinase signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2021, 22(6): 817.
[21] HOBBS G A, DER C J, ROSSMAN K L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance[J]. J Cell Sci, 2016, 129(7): 1287 – 1292.
[22] URAS I Z, MOLL H P, CASANOVA E. Targeting KRAS mutant non – small – cell lung cancer: past, present and future[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4325.
[23] DE LUCA A, MAIELLO M R, D′ALESSIO A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(Suppl 2): S17 – S27.
[24] 袁剑芳, 任春贞, 王旭勇, 等. Rho/Rock 信号通路在心肌纤维化中的作用及中医药干预研究进展[J/OL]. 中医学报, 1 – 9 [2026 – 03 – 18].
[25] MOON H, RO S W. MAPK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Cancers, 2021, 13(12): 3026.

收稿日期: 2025 – 12 – 24
作者简介: 林事成(1994 –), 男, 福建福州人, 博士研究生, 主要从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。
通信作者: 李泉旺, 男, 医学硕士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。E – mail: quanwangli@126.com

编辑: 刘凯歌